



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA FUCHSHUBER MIOLA

EFEITO DE CLONAZEPAM E MELATONINA SOBRE A MEMÓRIA DE RATOS
WISTAR SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO DE SONO

PALOTINA

2021

AMANDA FUCHSHUBER MIOLA

EFEITO DE CLONAZEPAM E MELATONINA SOBRE A MEMÓRIA DE RATOS
WISTAR SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO DE SONO

Dissertação apresentada ao programa de
Pós- Graduação em Ciência Animal, Setor
Palotina, Universidade Federal do Paraná,
como requisito à obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal, em formato de
artigo.

Orientadora: Profª Drª Erica Cristina Bueno
do Prado Guirro

PALOTINA

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Miola, Amanda Fuchshuber

M669 Efeito de clonazepam e melatonina sobre a memória de ratos
Wistar submetidos à privação de sono / Amanda Fuchshuber
Miola – Palotina, 2021.
34f.

Orientadora: Erica Cristina Bueno do Prado Guirro
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1. Benzodiazepínico. 2. Cognição. 3. Hormônio. 4. Insônia.

I. Guirro, Erica Cristina Bueno do Prado. II. Universidade

Ficha catalográfica elaborada por Liliane Cristina Soares Sousa – CRB 9/1736



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -
40001016077P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **AMANDA FUCHSHUBER MIOLA** intitulada: **EFEITO DE CLONAZEPAM E MELATONINA SOBRE A MEMÓRIA DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO DE SONO**, sob orientação da Profa. Dra. ERICA CRISTINA BUENO DO PRADO GUIRRO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 22 de Março de 2021.

Assinatura Eletrônica

22/03/2021 16:04:39.0

ERICA CRISTINA BUENO DO PRADO GUIRRO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

22/03/2021 16:06:52.0

BRUNO JACSON MARTYNHAK

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

22/03/2021 16:09:23.0

FABIOLA BONO FUKUSHIMA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

R. Pioneiro, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil

CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8529 - E-mail: ppgca.ufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 84226

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 84226

AGRADECIMENTOS

À professora Erica Cristina B. P. Guirro pelos anos de orientação, apoio e incentivo.

Aos amigos Juliana, Andressa, Mykael, Joaquim e Bruna pela amizade, companheirismo e pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos meus pais Maila e Edevandro pelo apoio e carinho e meus irmãos Fernanda e Lucas.

À minha avó Eurica por toda ajuda prestada e todo carinho.

Ao meu namorado Matheus por estar ao meu lado sempre.

À CAPES, pelo auxílio financeiro concedido na forma de bolsa de estudos. Ao PPGCA e à UFPR pela oportunidade de realizar o Mestrado.

RESUMO

O clonazepam é utilizado no tratamento da insônia e a melatonina é o hormônio produzido pela glândula pineal ligado ao ciclo sono/vigília. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do clonazepam e da melatonina sobre a memória de curto e longo prazo de ratos *Wistar* submetidos à privação de sono. Utilizou-se 96 animais distribuídos em 12 grupos combinados para avaliar o efeito do clonazepam (CLO) ou melatonina (MEL) comparado com placebo (CON) sobre a memória curta (MC) ou longa (ML) de ratos privados (CPS) ou não de sono (SPS). Após 24 horas de privação de sono, os animais receberam o fármaco e depois de 24 horas avaliou-se a memória com o teste de reconhecimento de objeto, sendo que animais sem déficit de memória permanecem mais tempo com um objeto novo (ON) do que com um objeto familiar (OF). Utilizou-se ANOVA de duas vias (tratamento e privação de sono) com medidas repetidas (objeto novo e familiar) e após o teste post hoc (Newman-Keuls). Os animais de MEL e CON gastaram menos tempo com o OC que os animais de CLO, independentemente de ser SPS ou CPS, tanto no teste de MC ou ML. Os animais de MEL foram os que mais investigaram o ON. Conclui-se que a melatonina não prejudica a memória de curto ou longo prazo de ratos submetidos ou não à privação de sono. Por outro lado, o clonazepam interfere negativamente na memória curta e longa dos animais, independentemente de haver ou não privação de sono.

Palavras-chave: Benzodiazepínico; cognição; hormônio; insônia.

ABSTRACT

Clonazepam is used to treat insomnia and melatonin is the hormone produced by the pineal gland and is related to the sleep/wakefulness cycle. The aim of this study was to evaluate the effect of clonazepam and melatonin on the short and long-term memory of Wistar rats submitted to sleep deprivation. Ninety-six animals were distributed in 12 groups to evaluate the effect of clonazepam (CLO), melatonin (MEL) compared to placebo (CON) on the short (MC) or long (ML) memory of private sleep (CPS) or not (SPS). After 24 hours of sleep deprivation, the animals received the drug and after 24 hours memory was assessed through the object recognition test, in which animals without a memory deficit are expected to remain longer with a new object (ON) than with an already known object (OC). Two-way ANOVA (treatment and sleep deprivation) with repeated measures (object) were performed with $p < 0.05$ and post hoc test (Newman-Keuls). MEL and CON animals spent less time with OC than CLO animals, regardless of whether they were SPS or CPS, either in the MC or ML test. MEL animals were the ones that most investigated ON. Concluding, melatonin does not impair the short or long term memory of rats submitted or not to sleep deprivation. On the other hand, clonazepam interferes negatively in the animals' short and long memory, regardless of whether or not there is sleep deprivation.

Keywords: Benzodiazepine; cognition; hormone; insomnia.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 9 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 13 |
| 2.1 Animais..... | 13 |
| 2.2 Privação de sono..... | 13 |
| 2.3 Experimento um: avaliação de memória de curto prazo..... | 14 |
| 2.3.1 Avaliação da memória | 15 |
| 2.4 Experimento dois: avaliação de memória de longo prazo | 17 |
| 2.4.1 Avaliação da memória | 17 |
| 2.5 Análise estatística | 18 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 19 |
| 3.1 Memória de Curto Prazo | 19 |
| 3.2. Memória de Longo Prazo | 23 |
| 4. CONCLUSÃO | 28 |
| 5. REFERÊNCIAS..... | 29 |

1. INTRODUÇÃO

O sono é uma propriedade fisiológica necessária para a manutenção da homeostase do organismo. A modificação do estado de consciência promovida pelo sono colabora para o funcionamento de atividades endócrinas, controle térmico, aprendizado, consolidação da memória, renovação de componentes celulares, conservação e restauração de energia, regulação hormonal, metabolismo dos carboidratos e aumento de marcadores inflamatórios (RIBEIRO et al., 2014; WIENER, 2016). Nesse contexto, perturbações do sono podem gerar consequências graves, comprometendo a qualidade de vida, o funcionamento físico, ocupacional, cognitivo e social do indivíduo (BILLIARD; BENTLEY, 2004; JANSEN et al., 2007).

O sono possui dois estágios: o sono de movimentos oculares não rápidos (NREM) e o de movimentos oculares rápidos (REM). O primeiro é composto por três etapas (N1, N2, N3) que se comportam em grau crescente de profundidade e é caracterizado pela redução gradativa da atividade cerebral, pelo relaxamento muscular com manutenção do tônus, além da diminuição dos movimentos corporais e das ondas eletroencefalográficas regulares (FERNANDES, 2006). Já o estágio REM é caracterizado por movimentos oculares rápidos, hipotonia ou atonia muscular, conservação da respiração, dessincronização nas ondas eletroencefalográficas e supressão da atividade na eletromiografia (DA SILVA, 1996). Nesse sentido, o ciclo sono-vigília geralmente ocorre na seguinte sequência: vigília, N1, N2, N3 e REM (NEVES et al., 2013).

As informações aprendidas requerem um período de sono adequado para serem retidas e é, possivelmente, durante o estágio de sono REM que são fixadas a longo ou a curto prazo. Dessa forma a privação ou o sono de má qualidade podem comprometer o processo de memorização e o raciocínio lógico (IDZIKOWSKI, 1984).

O estado de despertar é gerado através de uma interação dinâmica entre neurotransmissores como noradrenalina, serotonina, acetilcolina, dopamina e orexina e a promoção do sono está relacionada ao ácido gamaaminobutírico (GABA), glicina, melatonina e adenosina. O desequilíbrio entre essas

substâncias relaciona-se com a neurobiologia da insônia (GULYANI et al., 2012). A insônia é o transtorno do sono mais frequente na população e caracteriza-se como uma condição debilitante que consiste na dificuldade de iniciar ou manter o sono, apesar da existência de oportunidades adequadas para dormir (MARUICHI et al., 2011).

Dentre as classes farmacológicas mais utilizadas para o tratamento da insônia destacam-se os benzodiazepínicos, que alteram a arquitetura do sono e facilitam o início e a manutenção do sono (POYARES et al., 2004; WICKBOLDT et al., 2012). Essa classe é utilizada pois reduz a atividade e excitação do sistema nervoso central, produzindo um estado de sonolência (BALDWIN et al., 2013).

Os benzodiazepínicos atuam como moduladores alostéricos positivos do ácido gama-aminobutírico (GABA), que é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, sendo encontrado em altas concentrações no córtex e no sistema límbico. Por ser de natureza inibitória, ele reduz a excitabilidade dos neurônios. (HAEFELY et al., 1993). O GABA possui três receptores denominados de A, B e C. Os benzodiazepínicos atuam no receptor GABA_A, produzindo uma modificação estrutural, sendo modulador alostérico positivo, facilitando a abertura dos canais para cloreto, aumentando o influxo celular deste íon gerando hiperpolarização celular e com isso ocorre a inibição sináptica (ZORUMSKI; ISENBERG, 1991).

Porém essa classe possui efeitos colaterais importantes como desenvolvimento de tolerância e possível insônia rebote após a interrupção da medicação. Além disso, provoca sedação residual e sedação diurna, aumenta o risco de quedas e de confusão, exacerba possíveis dificuldades respiratórias subjacentes e gera problemas de memória de curto prazo (SCHUMANN et al., 2020). Há também uma possível relação entre o uso prolongado de benzodiazepínicos e o agravamento do declínio cognitivo juntamente com os processos de envelhecimento normal, levando ao aumento dos quadros de demência. (LAGNAOUI et al., 2002; WU et al., 2009; GAGE et al., 2012; GALLACHER et al., 2012). O clonazepam foi o segundo benzodiazepínico de alta potência descoberto. Esse fármaco se comporta como um agonista do

receptor GABA_A de forma altamente potente e de longa ação. Para o uso em ratos, verificou-se a dose de 1mg/kg (GRIFFIN et al., 2013).

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é o principal hormônio produzido pela glândula pineal que atua no ciclo circadiano de sono-vigília nos mamíferos (GRINGRAS et al., 2017). Quando empregada de forma terapêutica para tratar distúrbios do sono em adultos e crianças é considerada um medicamento relativamente não tóxico pois não produz efeitos colaterais significativos (SEABRA et al., 2000; GITTO et al., 2004; HUSSAIN et al., 2011). Ela atua via receptores de membrana MT1 e MT2 acoplados à proteína G (DUBOCOVICH, 1995; REPPERT et al., 1994), receptores nucleares da família do ácido retinóico (WIESENBERG et al., 1995), apresenta efeitos diretos em proteínas intracelulares como calmodulina ou tubulina (CARDINALI; FREIRE, 1975; BENÍTEZ-KING, 2006). Há relatos de administração da dose de 5mg/kg de melatonina para distúrbios do sono (DAHLITZ et al., 1991; MALHOTRA et al., 2004).

As funções da melatonina são divididas em cronobióticas e não-cronobióticas. Os efeitos cronobióticos englobam a regulação das funções fisiológicas e neuroendócrinas, como a sincronização dos ritmos reprodutivos sazonais (TAMARKIN et al., 1976), a regulação dos ciclos circadianos (ALONSO-VALE et al., 2008), do ciclo sono/vigília (LYSENG-WILLIAMSON, 2012), da temperatura (AOKI et al., 2008), do ritmo diário dos hormônios (IKEGAMI et al., 2019) e citocinas (CECON; MARKUS, 2011). Os efeitos não-cronobióticos possuem propriedades antioxidantes e de remoção de radicais livres, demonstrando função protetora em várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como a doença de Alzheimer (SRINIVASAN et al., 2005) e a doença de Parkinson (MILLER et al., 1996). Além disso, os efeitos não-cronobióticos estão relacionados à resposta de defesa imunológica (CECON; MARKUS, 2011), a efeitos anti-inflamatórios (GENOVESE et al., 2005), antidepressivos (ERGÜN et al., 2006), anticonvulsivantes (YAHYAVI-FIROUZ-ABADI et al., 2006) e analgésicos (MANTOVANI et al., 2006).

Existem quase 30 formas de realizar a privação de sono em roedores já descritas (Revel et al., 2009). Para inibição do sono REM um dos métodos mais utilizados é o modelo de Plataformas Múltiplas Modificado, adaptado do modelo

de plataforma (VAN HULZEN; COENEM; 1981). Nesse modelo utilizam-se múltiplas plataformas em um tanque preenchido com água para promover privação de sono em vários animais de uma única vez, pois assim os ratos estão livres para se movimentar no tanque de uma plataforma para outra e para interagir com os demais animais, o que reduz o estresse decorrente da imobilidade e do estresse social (SUCHECKI et al., 1998; MACHADO et al., 2004). A plataforma permite que o animal se acomode e obtenha sono NREM, porém ao se iniciar a fase REM ocorre perda de tônus muscular e como consequência a perda do equilíbrio postural, dessa forma o animal encosta na água, o que o faz despertar (MALLICK et al., 2011)

A privação do sono por uma noite pode prejudicar o desempenho em muitas tarefas cognitivas (DURMER; DINGES 2005; KILLGORE 2010). Em ratos, os protocolos de privação do sono podem variar de 24 até 96 horas (JEDDI et al., 2016; ALMEIDA, 2018). Estudos utilizando o protocolo de 24 horas demonstram que esse período de privação de sono já causa alterações e prejuízos, podendo ser utilizado como modelo experimental (ZHAO et al., 2018; PORCHERET et al., 2019).

A memória pode ser classificada segundo o tempo com que são adquiridas ou com relação ao seu conteúdo. Conforme o tempo em que são armazenadas, as memórias podem ser classificadas em memória a curto prazo ou a longo prazo. A memória de curto prazo está relacionada ao armazenamento temporário de informações, ou seja, durante um curto período. A memória de longo prazo diz respeito ao armazenamento de informações por um período maior (CECHELLA et al., 2014). Com relação ao conteúdo, a memória pode ser dividida em declarativa ou não declarativa. A memória declarativa diz respeito ao armazenamento de conhecimentos que podem ser intencionalmente recordados e a memória não declarativa está relacionada as atividades motoras e perceptivas (DE FARIA et al., 2020).

A memória de reconhecimento é a capacidade de julgar um item recentemente encontrado como familiar. A capacidade da memória de reconhecimento foi particularmente bem documentada em camundongos, ratos e macacos, bem como em humanos (MANNS et al., 2003). Ela pode ser testada em roedores usando tarefas de reconhecimento de objetos que são baseadas

na tendência espontânea que os roedores apresentam de explorar objetos novos quando os animais se lembram dos objetos aos quais eles foram previamente expostos (VEDOVELLI, 2011).

Dessa forma, o objetivo deste estudo é avaliar o efeito do clonazepam e da melatonina sobre a memória de curto e de longo prazo de ratos *Wistar* submetidos à 24 horas de privação de sono.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná setor Palotina sob protocolo número 07/2020.

2.1 Animais

O experimento foi realizado no Biotério Experimental de Roedores da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina. Para tanto foram utilizados 96 ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, variedade *Wistar*, com 45 dias de idade, sendo 50% de fêmeas e 50% de machos. Os animais foram mantidos em grupos de quatro animais do mesmo sexo em caixa de polipropileno (41x33x16cm), comumente utilizadas no alojamento de ratos. Os animais receberam ração peletizada própria para roedores de laboratório e água *ad libitum*. A temperatura foi controlada a $22 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e foi mantido o ciclo claro/escuro de 12 horas.

2.2 Privação de sono

Os animais passaram pelo protocolo da privação de sono três vezes em dias alternados e depois foi realizado o teste de reconhecimento de objeto com cada animal individualmente para avaliação da memória. Para isso, nos dias D1, D3 e D5 de experimento os animais dos grupos a serem privados de sono foram submetidos ao modelo de plataformas múltiplas modificadas. Para tanto, foram empregadas caixas organizadoras de plástico transparente (68 x 45 x 47 cm) com cilindros de concreto de 8 cm de altura e 8 cm de diâmetro, em número

correspondente ao número de ratos mais 50%, totalizando seis plataformas (FIGURA 1). Manteve-se o grupo de animais provenientes das caixas utilizadas na manutenção dos animais, evitando assim estresse adicional por restrição social e de movimento.

FIGURA 1 - CAIXA ORGANIZADORA COM CILINDROS DE CONCRETO UTILIZADA NO TESTE DE PLATAFORMAS MÚLTIPLAS MODIFICADO PARA PROMOVER RESTRIÇÃO DE SONO REM EM RATOS.



FONTE: O autor (2020).

A caixa organizadora foi preenchida com água até 1 cm abaixo do topo das plataformas. As tampas das caixas eram dotadas de diversas perfurações para permitir a troca de ar. Os animais permaneceram nesse aparato por 24 horas, iniciando sempre às oito horas da manhã.

Finalizada as 24 horas de privação de sono, os animais foram medicados conforme o grupo experimental e devolvidos à caixa de manutenção, totalizando três administrações. Os grupos que não participaram da privação de sono foram medicados em horário correspondente a fim de evitar erros nas comparações, sendo esta realizado sempre às oito horas da manhã.

2.3 Experimento um: avaliação de memória de curto prazo

Para avaliação da memória de curto prazo, os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- G1: 0,2mL água potável (veículo), sem privação de sono (controle);
- G2: 0,2mL água potável (veículo), com privação de sono;
- G3: 5mg/Kg melatonina, sem privação de sono (controle);
- G4: 5mg/Kg melatonina, com privação de sono;
- G5: 1mg/Kg clonazepam, sem privação de sono (controle);
- G6: 1mg/Kg clonazepam, com privação de sono.

2.3.1 Avaliação da memória

Após 24 horas da última privação de sono, os animais foram submetidos à avaliação de memória com o uso do teste de reconhecimento de objeto, realizado individualmente em uma arena de 75x75x75 cm sobre uma placa de vidro (FIGURA 2). Os animais eram colocados sempre no mesmo lugar dentro da arena, no canto oposto aos objetos. Esse teste compreende três sessões: habituação, aquisição e retenção. Entre os animais era realizada a limpeza do local com álcool 70° INPM para que não houvesse interferência de feromônios liberados pelos animais.

FIGURA 2 - ARENA E PLACA DE VIDRO UTILIZADAS NO TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS DE RATOS SUBMETIDOS OU NÃO À PRIVAÇÃO DE SONO E TRATADOS COM CLONAZEPAM, MELATONINA OU PLACEBO.



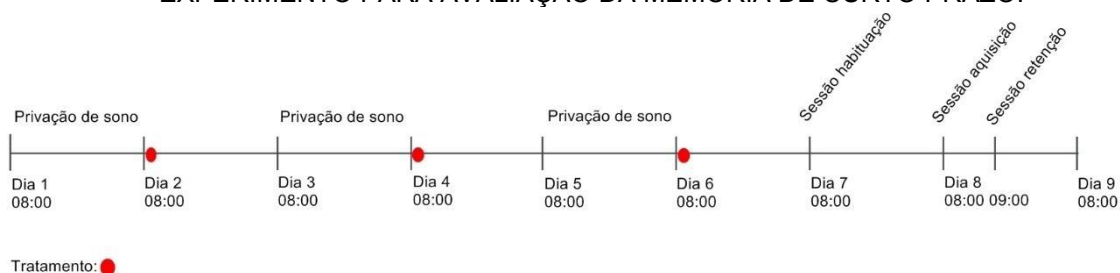
FONTE: O autor (2020).

Na sessão de habituação, cada animal permaneceu na arena por 15 minutos para que o animal se familiarizasse com o ambiente da arena.

A sessão de aquisição foi realizada 24 horas após a sessão de habituação e durou 10 minutos. Nessa sessão os animais foram individualmente colocados na arena na qual havia dois objetos idênticos. Os objetos utilizados foram duas garrafas de vidro transparente, de cerca de 30 cm, preenchidas com corante preto. Esses objetos foram denominados de objetos familiares.

A sessão de retenção levou 5 minutos e ocorreu 1 hora após a sessão de aquisição no teste de memória curta (FIGURA 3). Esta sessão visou verificar o quanto o animal reteve de memória e para isso um dos objetos familiares foi substituído por um objeto novo. Os objetos em questão possuíam peso suficiente para não serem arrastados pelos animais e eram diferentes entre si na cor, textura e forma. Neste estudo, utilizou-se uma lata cilíndrica amarela de 15cm de altura, preenchida com areia para se tornar pesada como objeto novo. Nessa sessão foi mensurado por um observador às cegas do tratamento o tempo de exploração do animal em cada um dos objetos, sendo esperado que os animais que retiveram memória passam a explorar mais o objeto novo do que o conhecido. A partir do tempo em segundos da exploração desses animais foi realizado um índice de reconhecimento (também chamado de índice de discriminação), que consiste em subtrair o tempo que o animal explorou o objeto novo (TON) e o tempo que o animal explorou o objeto familiar (TOF) dividido pela soma desses dois valores, na seguinte fórmula: $(TON - TOF) / (TON + TOF)$ (GOMES, 2015). A exploração de objetos é definida quando o animal está próximo ao objeto, cheirando, tocando ou observando o mesmo.

FIGURA 3 - LINHA DO TEMPO DEMONSTRANDO OS DIAS QUE OS ANIMAIS PASSARAM PELA PRIVAÇÃO DE SONO, OS DIAS DO TRATAMENTO E AS SESSÕES DO EXPERIMENTO PARA AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA DE CURTO PRAZO.



2.4 Experimento dois: avaliação de memória de longo prazo

Para avaliação da memória de longo prazo, os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- G7: 0,2mL água potável (veículo), sem privação de sono (controle);
- G8: 0,2mL água potável (veículo), com privação de sono;
- G9: 5mg/Kg melatonina, sem privação de sono (controle);
- G10: 5mg/Kg melatonina, com privação de sono;
- G11: 1mg/Kg clonazepam, sem privação de sono (controle);
- G12: 1mg/Kg clonazepam, com privação de sono.

2.4.1 Avaliação da memória

Após 24 horas da última privação de sono, os animais foram submetidos à avaliação de memória através do teste de reconhecimento de objeto, realizado individualmente em uma arena de 75x75x75 cm sobre uma placa de vidro. Os animais eram colocados sempre no mesmo lugar dentro da arena, no canto oposto aos objetos. Esse teste compreende três sessões: habituação, aquisição e retenção. Entre os animais era realizada a limpeza do local com álcool 70° INPM para que não houvesse interferência de feromônios liberados pelos animais.

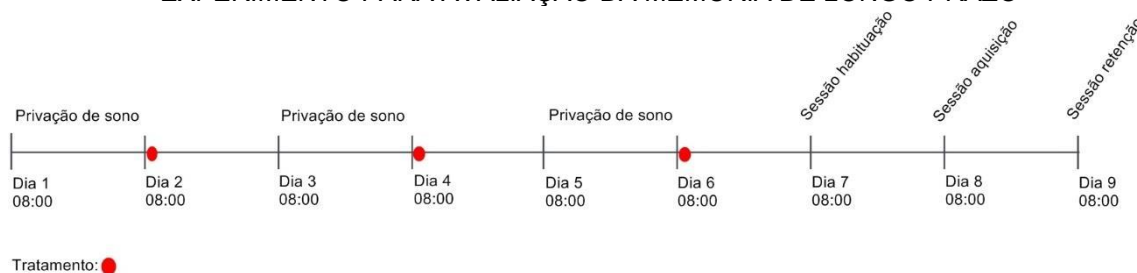
Na sessão de habituação, cada animal permaneceu na arena por 15 minutos para que o animal se familiarizasse com o ambiente da arena.

A sessão de aquisição foi realizada 24 horas após a sessão de habituação e durou 10 minutos. Nessa sessão os animais foram individualmente colocados na arena na qual havia dois objetos idênticos. Os objetos utilizados foram duas garrafas de vidro transparente, de cerca de 30 cm, preenchidas com corante preto. Esse objeto foi denominado de objeto familiar.

A sessão de retenção levou 5 minutos e ocorreu 24 horas após a sessão de aquisição no teste de memória longa (FIGURA 4). Esta sessão visou verificar o quanto o animal reteve de memória e para isso um dos objetos familiares foi substituído por um objeto novo. Os objetos em questão possuíam peso suficiente para não serem arrastados pelos animais e eram diferentes entre si na cor,

textura e forma. Neste estudo, utilizou-se uma lata cilíndrica amarela de 15cm de altura, preenchida com areia para se tornar pesada como objeto novo. Nessa sessão foi mensurado por um observador às cegas do tratamento o tempo de exploração do animal em cada um dos objetos, sendo esperado que os animais que retiveram memória passam a explorar mais o objeto novo do que o conhecido. A partir do tempo em segundos da exploração desses animais foi realizado um índice de reconhecimento (também chamado de índice de discriminação), que consiste em subtrair o tempo que o animal explorou o objeto novo (TON) e o tempo que o animal explorou o objeto familiar (TOF) dividido pela soma desses dois valores, na seguinte fórmula: $(TON - TOF) / (TON + TOF)$ (GOMES, 2015). A exploração de objetos é definida quando o animal está próximo ao objeto, cheirando, tocando ou observando o mesmo.

FIGURA 4 - LINHA DO TEMPO DEMONSTRANDO OS DIAS QUE OS ANIMAIS PASSARAM PELA PRIVAÇÃO DE SONO, OS DIAS DO TRATAMENTO E AS SESSÕES DO EXPERIMENTO PARA AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA DE LONGO PRAZO



2.5 Análise estatística

Para a realização da estatística dos dados foi utilizado o método de ANOVA de duas vias (tratamento e privação de sono) com medidas repetidas (objeto novo e familiar) para a média dos valores dos tempos em segundos e a ANOVA de duas vias para o índice de reconhecimento. Após isso, houve interação entre todos os dados, então foi realizado teste Newman-Keuls como post hoc.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Memória de Curto Prazo

Com relação ao índice de reconhecimento, a ANOVA fatorial detectou uma interação entre tratamento e privação de sono ($F_{2, 42} = 8.6115$, $p = 0.00073$) (FIGURA 5). O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou ($p < 0,05$) que o grupo dos animais que receberam melatonina e não passaram pela restrição de sono teve maior índice de discriminação em comparação com os outros grupos e o grupo que recebeu clonazepam e que passou pela privação obteve o menor índice em comparação com os outros grupos. Os animais privados do sono tiveram o índice de exploração menor em relação aos animais que não foram privados de sono ($F_{1, 42} = 6.2986$, $p = 0.01602$) (FIGURA 6) e o grupo de animais que receberam clonazepam obtiveram menor índice de exploração também ($F_{2,42} = 75.359$, $p = 0.00000$) (FIGURA 7).

FIGURA 5 – ÍNDICE DE RECONHECIMENTO EM RELAÇÃO Á MEMÓRIA DE CURTO PRAZO DOS ANIMAIS TRATADOS COM CLONAZEPAM E MELATONINA QUE PASSARAM OU NÃO PELA PRIVAÇÃO DE SONO. BARRAS VERTICAIS DENOTAM INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 0,95.

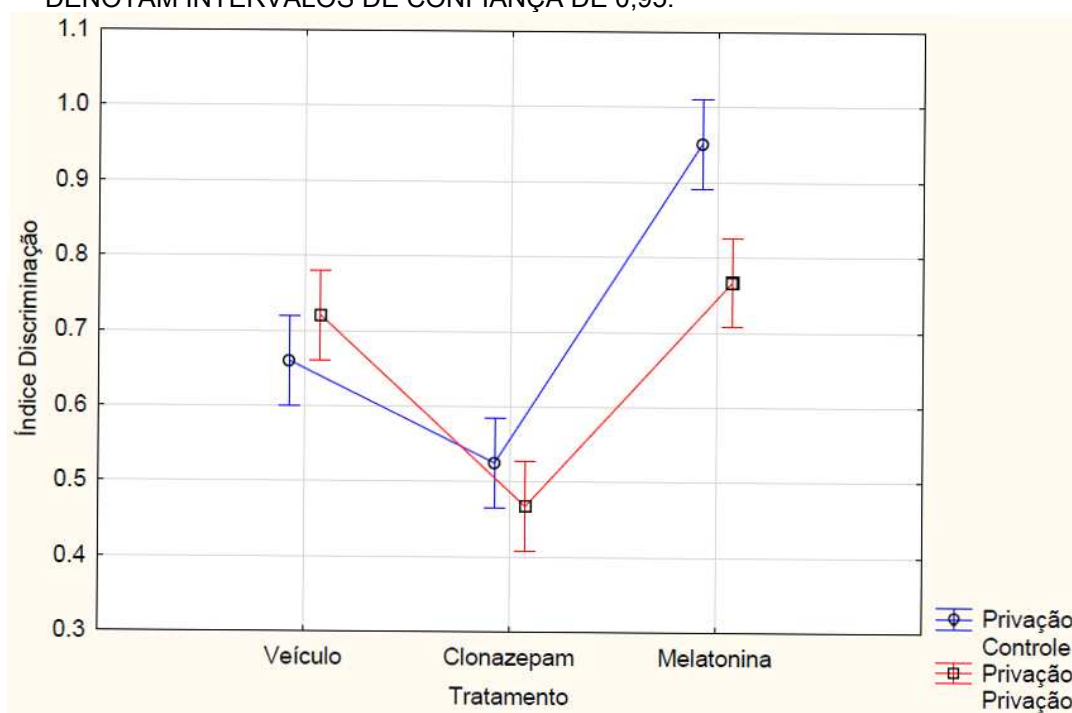


FIGURA 6 – ÍNDICE DE RECONHECIMENTO EM RELAÇÃO À MEMÓRIA DE CURTO PRAZO DOS ANIMAIS TRATADOS COM CLONAZEPAM E MELATONINA QUE PASSARAM OU NÃO PELA PRIVAÇÃO DE SONO. BARRAS VERTICAIS DENOTAM INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 0,95.

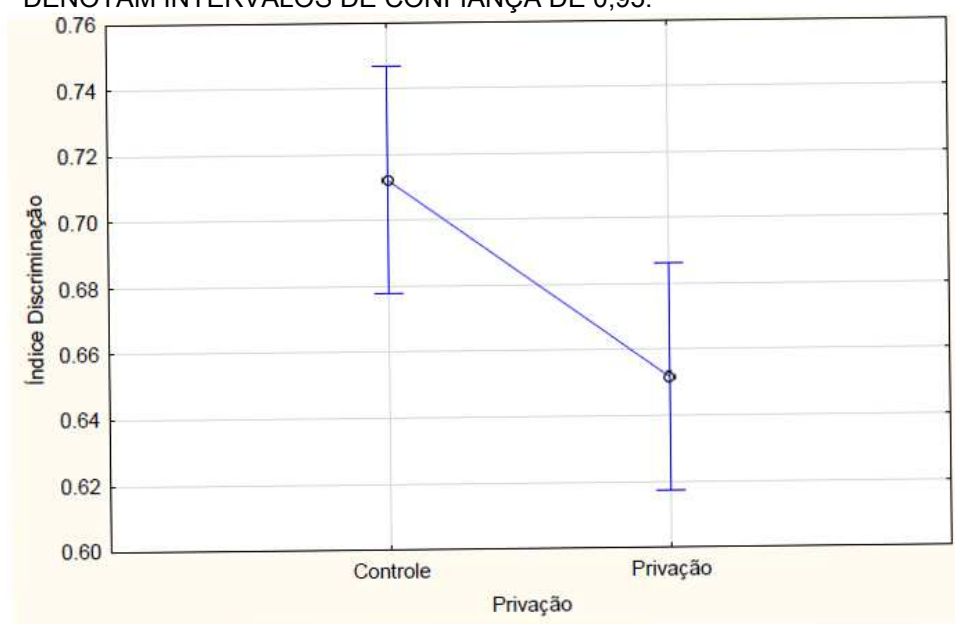
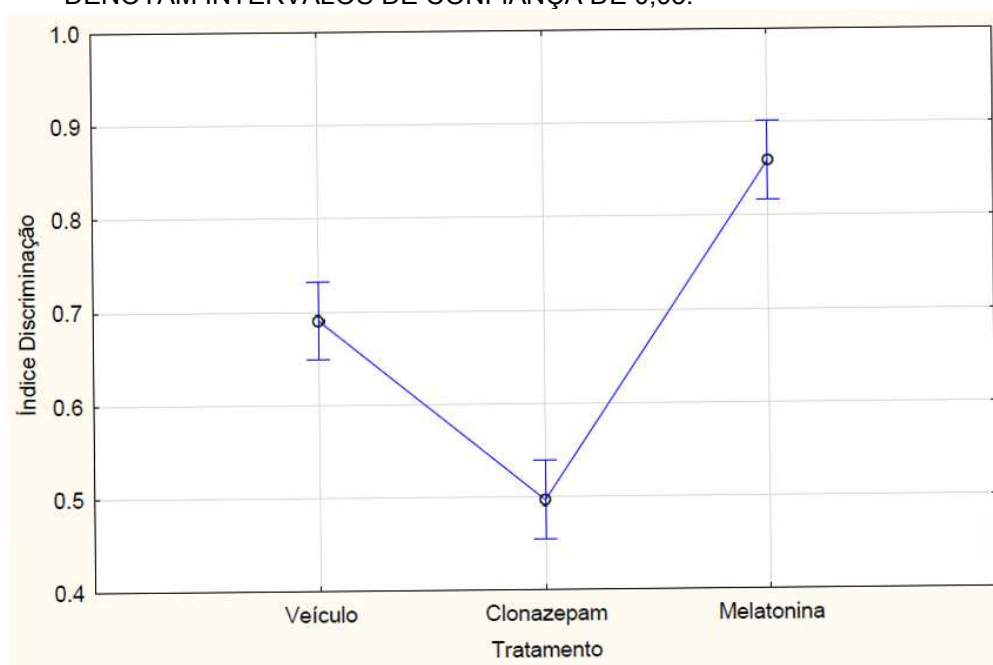


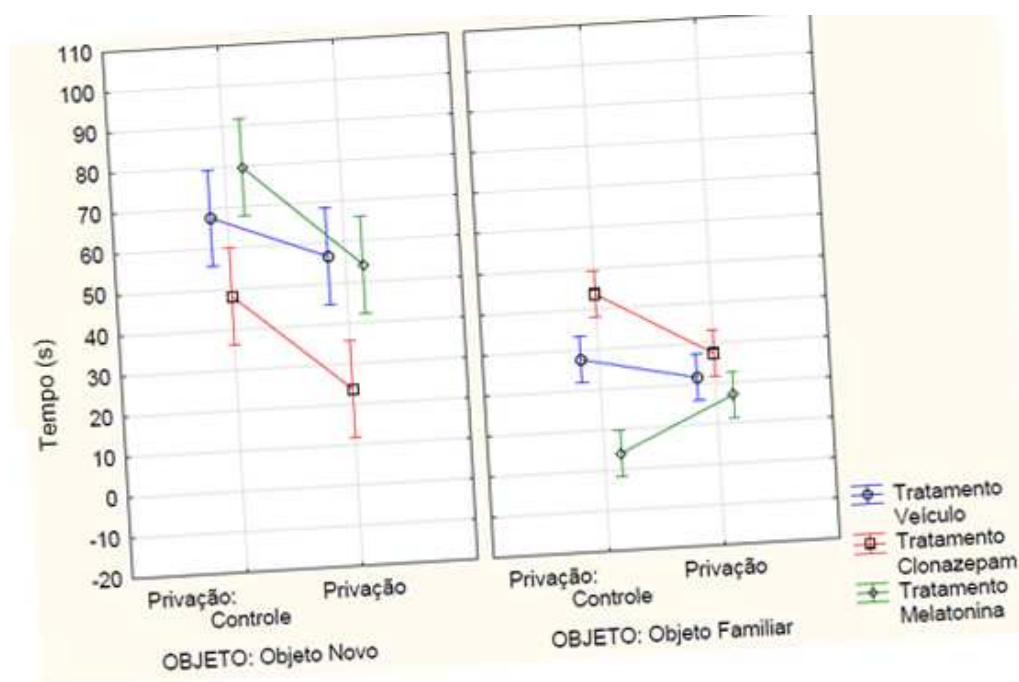
FIGURA 7 – ÍNDICE DE RECONHECIMENTO DOS ANIMAIS NO TESTE DE MEMÓRIA DE CURTO PRAZO EM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS RECEBIDOS: CLONAZEPAM, MELATONINA E GRUPO CONTROLE. BARRAS VERTICAIS DENOTAM INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 0,95.



Entre a média dos tempos de exploração em segundos a ANOVA fatorial detectou uma interação objeto, tratamento e privação de sono ($F_{2, 42} = 5.3684$, $p = 0.00839$) (FIGURA 8). O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou ($p < 0,05$) que o grupo dos animais que recebeu melatonina e que não passou pela privação de sono obteve menor tempo explorando o objeto familiar em relação a todos os outros grupos e maior tempo explorando o objeto novo também em relação aos outros grupos. Os animais que receberam melatonina e passaram pela restrição de sono tiveram diferença entre os tempos explorando o objeto familiar e o objeto novo, sendo que exploraram mais o objeto novo em relação aos animais que receberam clonazepam e passaram pela privação de sono.

O grupo que recebeu clonazepam e não passou pela restrição de sono não obteve diferença estatística entre o tempo de exploração do objeto novo e do familiar, assim como o grupo que recebeu clonazepam e passou pela restrição de sono.

FIGURA 8 – TEMPO EM SEGUNDOS EM RELAÇÃO À MEMÓRIA DE CURTO PRAZO DOS ANIMAIS TRATADOS COM CLONAZEPAM E MELATONINA QUE PASSARAM OU NÃO PELA PRIVAÇÃO DE SONO. BARRAS VERTICAIS DENOTAM INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 0,95.



A melatonina é um hormônio natural produzido principalmente pela glândula pineal, sendo o principal regulador do ciclo circadiano e participa da consolidação da memória. Além disso, a melatonina pode interagir com a proteína calmodulina, (LEÓN et al., 2006) que tem importante ação em funções neurais, incluindo a cognição (BENITO; BARCO, 2010; ORTEGA-MARTÍNEZ, 2015) indicando que a melatonina pode afetar positivamente as funções cognitivas (IWASHITA et al., 2021).

A melatonina também tem ação na modulação dos níveis de moléculas de adesão celular neural, na região do hipocampo dos animais. Essas moléculas estão envolvidas no circuito neural e participam do processamento cognitivo, significando que a melatonina modula a plasticidade neuronal e está relacionada nos processos de memória e aprendizagem (BAYDAS et al., 2008).

Ao se comparar os fármacos verificou-se que o grupo tratado com melatonina foi o que mais explorou o objeto novo e que menos investigou o objeto familiar, ao contrário do que se observou nos animais que receberam clonazepam, em que houve o menor tempo de exploração no objeto novo e maior tempo de exploração do objeto familiar. Isso demonstra que a melatonina foi menos deletéria à memória quando comparada ao clonazepam, que apresentou prejuízo na retenção de informações.

Os animais tratados com clonazepam exploraram ambos os objetos por tempo semelhante, pois aparentemente não se recordavam que já conheciam um dos objetos. O uso de benzodiazepínicos não prejudica a memória da informação adquirida antes da administração da droga, denominada de memória retrógrada. Porém a aquisição de novas informações após a ingestão da droga (memória anterógrada) é prejudicada pelo uso dessa classe farmacológica (IZQUIERDO; MEDINA, 1997; GRAEFF; GUIMARÃES, 1999; LADER, 2011).

Já nos animais tratados com melatonina, o tempo de exploração do objeto novo foi significativamente maior que o do objeto familiar, demonstrando que o animal se lembrava do objeto ao qual já havia sido exposto. Assim, pode-se sugerir que a melatonina não interferiu negativamente na memória dos ratos e eles conseguiram lembrar que já conheciam um dos objetos e passaram a explorar mais o objeto novo.

No tratamento com melatonina, os animais não privados de sono exploraram mais o objeto novo que os animais submetidos à insônia. Isso reitera que o descanso adequado garante melhor armazenamento de informações.

3.2. Memória de Longo Prazo

Com relação ao índice de reconhecimento, a ANOVA fatorial detectou uma interação entre tratamento e privação de sono ($F_{2, 42} = 5.6046$, $p = 0.00696$) (FIGURA 9). O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou ($p < 0,05$) que o grupo dos animais que receberam melatonina e não passaram pela privação de sono obteve maior índice de discriminação em relação ao grupo que recebeu clonazepam e não passou pela privação de sono e em relação ao grupo que recebeu melatonina e passou pela privação de sono. Os animais que receberam clonazepam e não passaram pela privação de sono tiveram menor índice de discriminação em comparação com os outros grupos sem restrição de sono e em relação ao grupo clonazepam com privação de sono. Apesar de não haver diferença estatística, os animais privados do sono tiveram o índice de exploração menor em relação aos animais que não foram privados de sono ($F_{1, 42} = 0.46355$, $p = 0.49970$) (FIGURA 10). O grupo de animais que recebeu clonazepam obteve estatisticamente índice menor de exploração em relação aos outros grupos ($F_{2, 42} = 7.4374$, $p = 0.00172$) (FIGURA 11).

FIGURA 9 – ÍNDICE DE RECONHECIMENTO EM RELAÇÃO À MEMÓRIA DE LONGO PRAZO DOS ANIMAIS TRATADOS COM CLONAZEPAM E MELATONINA QUE PASSARAM OU NÃO PELA PRIVAÇÃO DE SONO. BARRAS VERTICAIS DENOTAM INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 0,95.

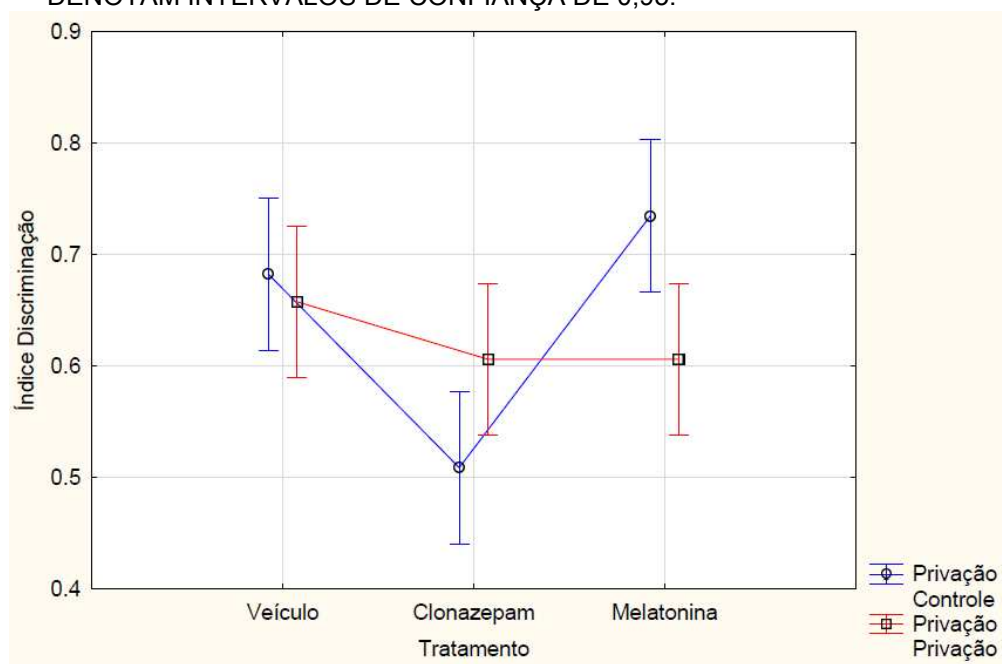


FIGURA 10 – ÍNDICE DE RECONHECIMENTO EM RELAÇÃO À MEMÓRIA DE LONGO PRAZO DOS ANIMAIS TRATADOS COM CLONAZEPAM E MELATONINA QUE PASSARAM OU NÃO PELA PRIVAÇÃO DE SONO. BARRAS VERTICAIS DENOTAM INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 0,95.

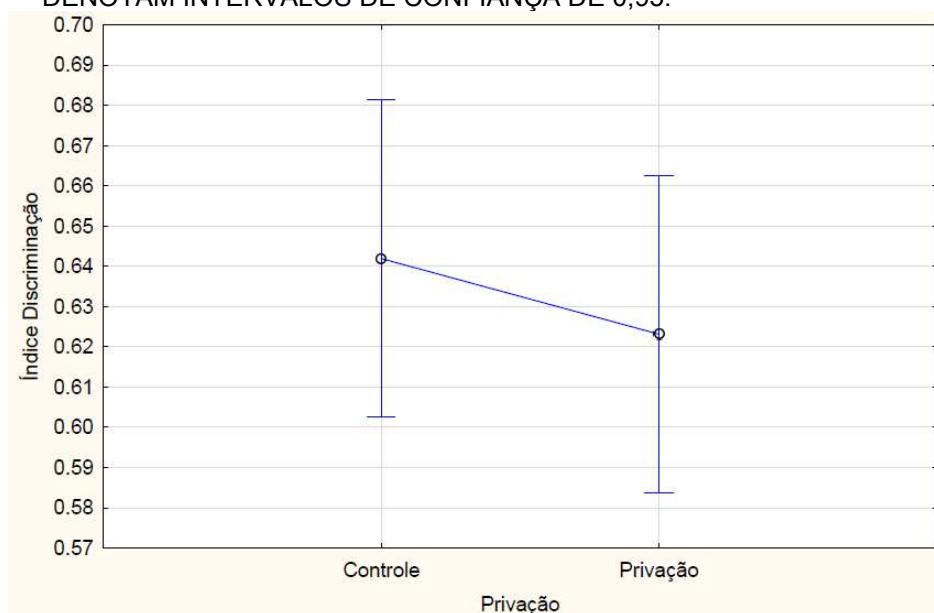
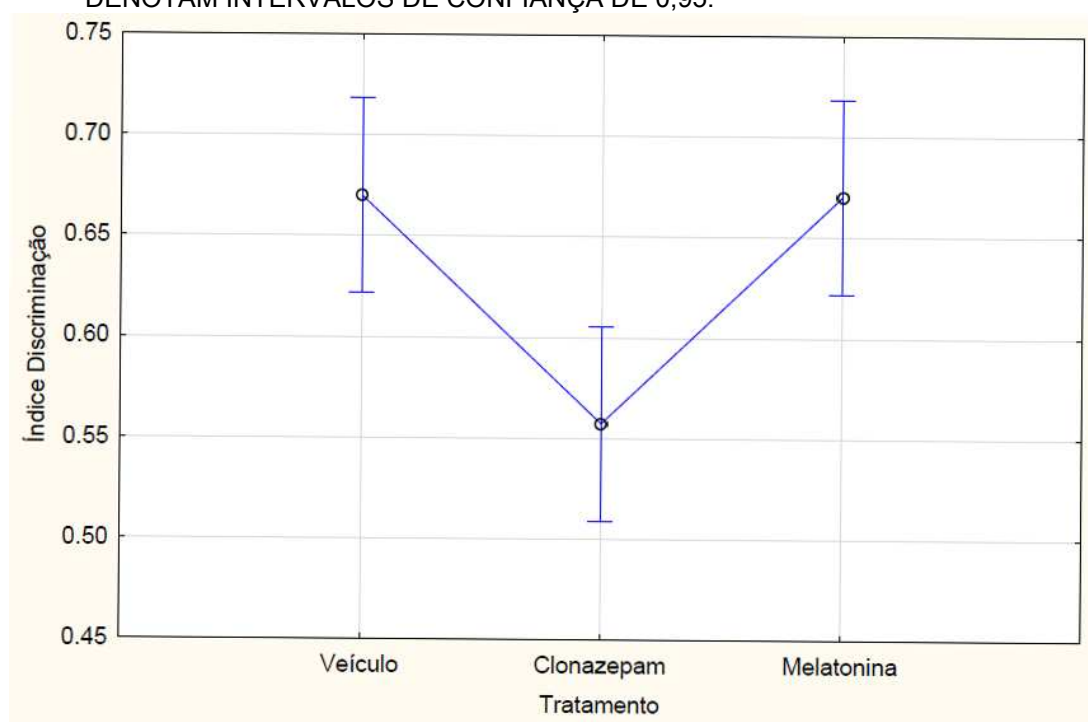
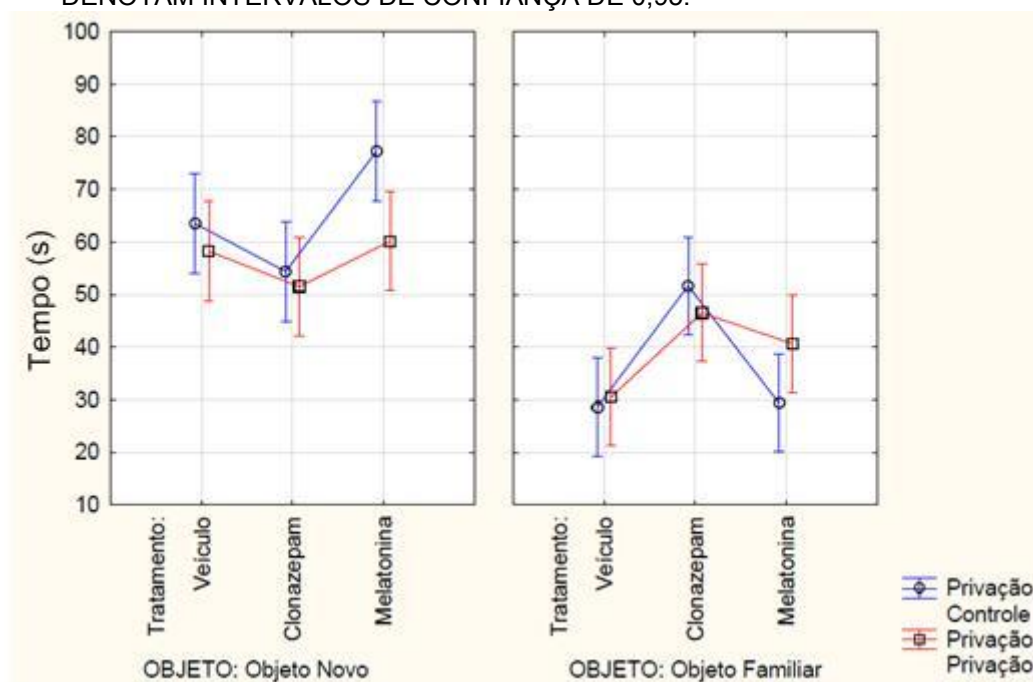


FIGURA 11 – ÍNDICE DE RECONHECIMENTO DOS ANIMAIS NO TESTE DE MEMÓRIA DE LONGO PRAZO EM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS RECEBIDOS: CLONAZEPAM, MELATONINA E GRUPO CONTROLE. BARRAS VERTICAIS DENOTAM INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 0,95.



Entre a média dos tempos de exploração em segundos a ANOVA fatorial detectou uma interação objeto, tratamento e privação de sono ($F_{2, 42} = 4.1487$, $p = 0.02269$) (FIGURA 12). O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou ($p < 0,05$) que o grupo de animais que recebeu melatonina e não passou pela privação de sono obteve o maior tempo explorando o objeto novo em relação a todos os outros grupos e o menor tempo de exploração do objeto familiar em relação aos animais que receberam clonazepam e não passaram pela privação de sono. O grupo da melatonina que passou pela privação de sono explorou mais o objeto novo em relação ao grupo da melatonina que não passou pela privação de sono e foi diferente estatisticamente do grupo da melatonina que passou pela privação de sono e explorou o objeto familiar. Com relação aos grupos que receberam clonazepam observou-se que no grupo clonazepam o tempo de exploração do objeto novo ou familiar foi semelhante, independentemente de haver ou não privação de sono. Além disso, houve menor exploração de ambos os objetos em relação os animais que receberam melatonina, com ou sem a privação de sono.

FIGURA 12 – TEMPO EM SEGUNDOS EM RELAÇÃO À MEMÓRIA DE LONGO PRAZO DOS ANIMAIS TRATADOS COM CLONAZEPAM E MELATONINA QUE PASSARAM OU NÃO PELA PRIVAÇÃO DE SONO. BARRAS VERTICAIS DENOTAM INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 0,95.



Os animais tratados com melatonina que não passaram pela restrição de sono apresentaram o tempo de investigação do objeto novo significativamente maior que o dispendido com o objeto conhecido. Os animais tratados com clonazepam obtiveram maior tempo de investigação do objeto familiar e menor tempo de investigação do objeto novo. Isso demonstra que os animais tratados com clonazepam tiveram déficit na retenção da memória longa e provavelmente não se recordaram do objeto familiar, explorando os dois objetos, tanto o novo quanto o conhecido. Já os animais tratados com a melatonina se recordaram do objeto conhecido e exploraram mais o objeto novo.

Alguns autores relatam que há aumento no risco de demência e da doença de Alzheimer com o uso de benzodiazepínicos (INOUE et al., 2014; ROSENBERG, 2015; IMFELD et al., 2015; GAGE et al., 2015). Apesar de serem muito relatados, os mecanismos envolvidos na deficiência da memória são pouco conhecidos. Testes em humanos demonstram que os benzodiazepínicos afetam negativamente a memória de longo prazo perto do momento do pico de concentração sanguínea da droga (BUFFETT-JERROTT; STEWART, 2002),

porém a maioria dos artigos se limitam a descrever apenas que existe o déficit, sem explicar as possíveis causas.

Griffin et al. (2013) relataram que os benzodiazepínicos comprometem a memória de longo prazo em humanos. Além disso, Buffett-Jerrott e Sterwart em 2002 documentaram déficits cognitivos e perda de memória em humanos como efeitos indesejados de benzodiazepínicos.

Alguns autores relatam que a melatonina melhora a memória e previne danos, como relatado por Shen et al. (2002) que demonstra que reduziu as alterações da memória espacial e o dano oxidativo neural em camundongos tratados com D-galactose. No presente estudo a melatonina não interferiu negativamente na memória dos animais, tanto memória de curto prazo, quanto memória de longo prazo.

4. CONCLUSÃO

A melatonina não prejudica a memória de curto ou longo prazo de ratos submetidos ou não à privação de sono. Por outro lado, o clonazepam interfere negativamente na memória de curta e longo prazo dos animais, independentemente de haver ou não privação de sono. Assim, a melatonina pode ser uma possível alternativa na substituição do clonazepam para o tratamento da insônia.

5. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. P. C. Efeito da administração de bebida energizante no comportamento de ratos privados de sono. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Universidade de Brasília, Brasília, 2018.
- ALONSO-VALE, M. I. C. et al. Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes. *Journal of Pineal Research*, v.45, n.4, p.422-429, 2008.
- AOKI, K. et al. Exogenous melatonin administration modifies cutaneous vasoconstrictor response to whole body skin cooling in humans. *Journal of Pineal Research*, v.44, n.2, p.141-148, 2008.
- BALDWIN, D. S. et al. Benzodiazepines: risks and benefits. A reconsideration. *Journal of Psychopharmacology*, v.27, n.11, p.967-971, 2013.
- BAYDAS, G. et al. Melatonin prevents gestational hyperhomocysteinemia-associated alterations in neurobehavioral developments in rats. *Journal of Pineal Research*, v.44, n.2, p.181-188, 2008.
- BENÍTEZ-KING, G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *Journal of Pineal Research*, v.40, n.1, p.1-9, 2006.
- BENITO, E.; BARCO, A. CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. *Trends in Neurosciences*, v.33, n.5, p.230-240, 2010.
- BILLIARD, M.; BENTLEY, A. Is insomnia best categorized as a symptom or a disease? *Sleep Medicine*, v.5, p.S35-S40, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Panorama dos dados do sistema nacional de gerenciamento de produtos controlados: um sistema para o monitoramento de medicamentos no Brasil. *Boletim de Farmacoepidemiologia*. Brasília (DF): Anvisa; 2011. Disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/sngpc/boletins/2011/boletim_sngpc_2edatualizada.pdf
- BUFFETT-JERROTT, S. E.; STEWART, S. H. Cognitive and sedative effects of benzodiazepine use. *Current Pharmaceutical Design*, v.8, n.1, p.45-58, 2002.
- CARDINALI, D. P.; FREIRE, F. Melatonin effects on brain. Interaction with microtubule protein, inhibition of fast axoplasmic flow and induction of crystalloid and tubular formations in the hypothalamus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.2, n.5, p.317-330, 1975.
- CECON, E.; MARKUS, P. R. Relevance of the chronobiological and non-chronobiological actions of melatonin for enhancing therapeutic efficacy in neurodegenerative disorders. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug discovery*, v.5, n.2, p.91-99, 2011.

CECHELLA, J. L. et al. Diphenyl diselenide-supplemented diet and swimming exercise enhance novel object recognition memory in old rats. *Age*, v.36, n.4, p.966-974, 2014.

DA SILVA, R. S. Introdução ao estagiamento do sono humano. *Brazilian Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, v.2, n.3, p.187-199, 1996.

DAHLITZ, M. et al. Delayed sleep phase syndrome response to melatonin. *The Lancet*, v.337, n.8750, p.1121-1124, 1991.

DE FARIA, R. S. et al. Efeito do estresse crônico na memória espacial de curto e longo prazo em ratos Wistar. *Health Sciences Journal*, v.10, n.3, p.9-14, 2020.

DUBOCOVICH, M. L. et al. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Frontiers in Bioscience*, v.8, n.10, p.1093-108, 2003.

DURMER, J. S.; DINGES, D. F. Neurocognitive consequences of sleep deprivation. In: *Seminars in Neurology*. Thieme Medical Publishers, p.117-129, 2005.

ERGÜN, Y. et al. Co-administration of a nitric oxide synthase inhibitor and melatonin exerts an additive antidepressant-like effect in the mouse forced swim test. *Medical Science Monitor*, v.12, n.9, p.BR307-BR312, 2006.

FERNANDES, R. M. F. O sono normal. *Medicina (Ribeirão Preto)*, v.39, n.2, p.157-168, 2006.

GAGE, S. B. et al. Benzodiazepine use and risk of dementia: prospective population based study. *Bmj*, v.345, 2012.

GAGE, S.; PARIENTE, A.; BÉGAUD, B. Is there really a link between benzodiazepine use and the risk of dementia? *Expert opinion on drug safety*, v.14, n.5, p.733-747, 2015.

GALLACHER, J. et al. Benzodiazepine use and risk of dementia: evidence from the Caerphilly Prospective Study (CaPS). *Journal of Epidemiology and Community Health*, v.66, n.10, p.869-873, 2012.

GENOVESE, T. et al. Melatonin limits lung injury in bleomycin treated mice. *Journal of Pineal Research*, v.39, n.2, p.105-112, 2005.

GITTO, E. et al. Melatonin reduces oxidative stress in surgical neonates. *Journal of Pediatric Surgery*, v.39, n.2, p.184-189, 2004.

GOMES, F. V. Tratamento repetido com canabidiol atenua alterações comportamentais e moleculares em um modelo de esquizofrenia baseado no antagonismo dos receptores NMDA. 219 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. Fundamentos de psicofarmacologia. In: Fundamentos de Psicofarmacologia. p.238-238, 2000

GRIFFIN, C. E. et al. Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. *Ochsner Journal*, v.13, n.2, p.214-223, 2013.

GRINGRAS, P. et al. Efficacy and safety of pediatric prolonged-release melatonin for insomnia in children with autism spectrum disorder. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, v.56, n.11, p.948-957. e4, 2017.

GULYANI, S.; SALAS, R. E.; GAMALDO, C. E. Sleep medicine pharmacotherapeutics overview: today, tomorrow, and the future (Part 1: insomnia and circadian rhythm disorders). *Chest*, v.142, n.6, p.1659-1668, 2012.

HAEFELY, W. E. et al. The multiplicity of actions of benzodiazepine receptor ligands. *Canadian Journal of Psychiatry*. v.38, p.S102, 1993.

HUSSAIN, S. A. R. et al. Adjuvant use of melatonin for treatment of fibromyalgia. *Journal of pineal research*, v.50, n.3, p.267-271, 2011.

IDZIKOWSKI, C. Sleep and memory. *British Journal of Psychology*, v.75, n.4, p.439-449, 1984.

IKEGAMI, K. et al. Interconnection between circadian clocks and thyroid function. *Nature Reviews Endocrinology*, v.15, n.10, p.590-600, 2019.

IMFELD, P. et al. Benzodiazepine use and risk of developing alzheimer's disease or vascular dementia: A case-control analysis. *Drug Safety*, v.38, n.10, p.909-919, 2015.

INOUE, S.; WESTENDORP, R.; SACZYNSKI, J. Link between Alzheimer's disease and benzodiazepines suspected. *Nursing Older People*, v.26, n.10, p.13, 2014.

IWASHITA, H. et al. The melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine facilitates long-term object memory in young and aging mice. *Journal of Pineal Research*, v.70, n.1, p. e12703, 2021.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. The biochemistry of memory formation and its regulation by hormones and neuromodulators. *Psychobiology*, v.25, n.1, p.1-9, 1997.

JANSEN, J. M., et al. Medicina da noite: da cronobiologia à prática clínica [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2007. 340 p. ISBN 978-85-7541-336-4. Disponível em: <https://static.scielo.org/scielobooks/3qp89/pdf/jansen-9788575413364.pdf>.

JEDDI, S. et al. O Efeito da Privação de Sono na Função Cardíaca e Tolerância à Lesão de Isquemia-Reperfusão em Ratos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.106, n.1, p.41-48, 2016.

KILLGORE, W. D. S. Effects of sleep deprivation on cognition. In: Progress in Brain Research. Elsevier, p.105-129, 2010.

LADER, M. Benzodiazepines revisited—will we ever learn? Addiction, v.106, n.12, p.2086-2109, 2011.

LAGNAOUI, R. et al. Benzodiazepine use and risk of dementia: a nested case-control study. Journal of Clinical Epidemiology, v.55, n.3, p.314-318, 2002.

LEÓN, J. et al. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin. Journal of Neurochemistry, v.98, n.6, p.2023-2033, 2006.

LYSENG-WILLIAMSON, K. A. Melatonin prolonged release. Drugs and Aging, v.29, n.11, p.911-923, 2012.

MACHADO, R. B. et al. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. Brain Research, v.1004, n.1-2, p.45-51, 2004.

MALHOTRA, S.; SAWHNEY, G.; PANDHI, P. The therapeutic potential of melatonin: a review of the science. Medscape General Medicine, v.6, n.2, 2004.

MALLICK, B. N.; SINGH, A. REM sleep loss increases brain excitability: Role of noradrenalin and its mechanism of action. Sleep Medicine Reviews, v. 15, n.3, p.165-178, 2011.

MANNS, J. R. et al. Recognition memory and the human hippocampus. Neuron, v.37, n.1, p.171-180, 2003.

MANTOVANI, M. et al. Mechanisms involved in the antinociception caused by melatonin in mice. Journal of Pineal Research, v.41, n.4, p.382-389, 2006.

MARUICHI, M. D. et al. Avaliação da prevalência de insônia associada a medidas de higiene do sono em usuários do Centro de Saúde Escola Barra Funda Dr. Alexandre Vranjac. Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, v.56, n.2, p.61-64, 2018.

MILLER, J. W.; SELHUB, J.; JOSEPH, J. A. Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: protective effects of O-methylation and melatonin. Free Radical Biology and Medicine, v.21, n.2, p.241-249, 1996.

NEVES, G. M. et al. Transtornos do sono: visão geral. Revista Brasileira de Neurologia, v.49, n.2, p.57-71, 2013.

ORTEGA-MARTÍNEZ, S. A new perspective on the role of the CREB family of transcription factors in memory consolidation via adult hippocampal neurogenesis. Frontiers in Molecular Neuroscience, v.8, p.46, 2015.

PORCHERET, K. et al. Investigation of the impact of total sleep deprivation at home on the number of intrusive memories to an analogue trauma. *Translational Psychiatry*, v.9, n.1, p.1-13, 2019.

POYARES, D. et al. Chronic benzodiazepine usage and withdrawal in insomnia patients. *Journal of Psychiatric Research*, v.38, n.3, p. 327-334, 2004.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R.; EBISAWA, T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*, v.13, n.5, p.1177-1185, 1994.

REVEL, F. G. et al. Rodent models of insomnia: a review of experimental procedures that induce sleep disturbances. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v.33, n.6, p.874-899, 2009.

RIBEIRO, C. R. F.; SILVA, Y. M. G. P.; OLIVEIRA, S. M. C. de. O impacto da qualidade do sono na formação médica. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*, v.12, n.1, p.8-14, 2014.

ROSENBERG, P. B. Benzodiazepine exposure increases risk of Alzheimer's disease. *BMJ Evidence-Based Medicine*, v.20, n.2, p.75-75, 2015.

SCHUMANN, T. F. et al. A Prevalência da insônia no meio médico e o uso de substâncias relacionadas. *Revista de Saúde*, v.11, n.1, p.67-76, 2020.

SEABRA, M. de L. V. et al. Randomized, double-blind clinical trial, controlled with placebo, of the toxicology of chronic melatonin treatment. *Journal of Pineal Research*, v.29, n.4, p.193-200, 2000.

SHEN, Y. et al. Melatonin reduces memory changes and neural oxidative damage in mice treated with D-galactose. *Journal of Pineal Research*, v.32, n.3, p.173-178, 2002.

SRINIVASAN, V. et al. Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicity Research*, v.7, n.4, p.293-318, 2005.

SUCHECKI, D. et al. Increased ACTH and corticosterone secretion induced by different methods of paradoxical sleep deprivation. *Journal of Sleep Research*, v.7, n.4, p.276-281, 1998.

TAMARKIN, L. et al. Effect of melatonin on the reproductive systems of male and female Syrian hamsters: a diurnal rhythm in sensitivity to melatonin. *Endocrinology*, v.99, n.6, p.1534-1541, 1976.

VAN HULZEN, Z. J. M.; COENEN, A. M. L. Paradoxical sleep deprivation and locomotor activity in rats. *Physiology and Behavior*, v.27, n.4, p.741-744, 1981.

VEDOVELLI, K. Efeitos do ambiente enriquecido nos níveis centrais e periférico de BDNF e sua relação com o desempenho na tarefa de reconhecimento de objetos em ratos. *Dissertação (Mestrado)*. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2011.

WICKBOLDT, A. T. et al. Sleep physiology, abnormal States, and therapeutic interventions. *Ochsner Journal*, v.12, n.2, p.122-134, 2012.

WIENER, R. C. Relationship of routine inadequate sleep duration and periodontitis in a nationally representative sample. *Sleep Disorders*, v.2016, 2016.

WIESENBERG, I. et al. Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR α by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Research*, v.23, n.3, p.327-333, 1995.

WU, C. et al. The association between dementia and long-term use of benzodiazepine in the elderly: nested case–control study using claims data. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, v.17, n.7, p.614-620, 2009.

YAHYAVI-FIROUZ-ABADI, N. et al. Involvement of nitric oxide pathway in the acute anticonvulsant effect of melatonin in mice. *Epilepsy Research*, v.68, n.2, p.103-113, 2006.

YELESWARAM, K. et al. Pharmacokinetics and oral bioavailability of exogenous melatonin in preclinical animal models and clinical implications. *Journal of Pineal Research*, v.22, n.1, p.45-51, 1997.

ZHAO, R. et al. Decreased cortical and subcortical response to inhibition control after sleep deprivation. *Brain Imaging and Behavior*, v.13, n.3, p.638-650, 2019.

ZORUMSKI, C. F.; ISENBERG, K. E. Insights into the structure and function of GABA-benzodiazepine receptors: ion channels and Psychiatry. *American Journal of Psychiatry*, v.148, n.2, p.162, 1991.